

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
 - TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - FADED TEXT
 - ILLEGIBLE TEXT
 - SKEWED/SLANTED IMAGES
 - COLORED PHOTOS
 - BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
 - GRAY SCALE DOCUMENTS
-

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 76 35149

(54) **Combinaisons à activité biologique, leur procédé de préparation.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). **C 07 G 7/00, 11/00, 13/00; C 08 F 8/12, 234/02;
C 12 K 1/04; G 01 N 31/08, 33/16.**

(22) Date de dépôt **22 novembre 1976, à 16 h 5 mn.**

(33) (32) (31) **Priorité revendiquée : Demande de brevet déposée en République Fédérale d'Allemagne
le 22 novembre 1975, n. P 25 52 510.4 au nom de la demanderesse.**

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande **B.O.P.I. — «Listes» n. 24 du 17-6-1977.**

(71) **Déposant : Société dite : BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, résidant en République
Fédérale d'Allemagne.**

(72) **Invention de :**

(73) **Titulaire : Idem (71)**

(74) **Mandataire : Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.**

L'invention concerne de nouvelles combinaisons de substances ayant une activité biologique et de composés insolubles dans l'eau à haut poids moléculaire, un procédé pour préparer ces composés et leur utilisation de préférence dans la chromatographie d'affinité.

5 Dans les dernières années, une nouvelle technique dans les méthodes de travail biochimiques s'est imposée. Sa caractéristique principale est la mise en oeuvre de l'affinité de substances ayant une activité biologique liées à un support pour effectuer des réactions sélectives.

10 Grâce à la formation d'un complexe spécifique de la substance liée au support avec une deuxième substance contenue dans un mélange, cette substance peut être éliminée du mélange et isolée, si on le désire, ensuite par désorption.

Les enzymes liées à un support ont l'avantage de permettre des
15 transformations de substances dans des procédés continus de préparation et d'obtenir les produits réactionnels exempts d'enzymes.

Dans l'analyse enzymatique biochimique, les enzymes insolubles dans l'eau liées à un support peuvent être utilisées plusieurs fois comme réactifs.

20 En raison de la propriété des enzymes d'avoir des affinités non seulement à l'égard des substrats, mais aussi à l'égard des inhibiteurs spécifiques, l'obtention d'inhibiteurs enzymatiques à l'aide de la chromatographie d'affinité sur des enzymes liées à un support s'est avéré particulièrement favorable. D'autre part, la fixation
25 d'inhibiteurs à des matrices insolubles dans l'eau permet l'obtention préparative des enzymes correspondantes.

Des antigènes ou des anticorps, que l'on appelle agents d'immunoabsorption, sont fixés à des matrices insolubles dans l'eau et permettent ensuite l'isolement des anticorps ou antigènes correspondants.

30 Par substances ayant une activité biologique, on entend, conformément à ce qui a été décrit ci-dessus, des substances naturelles ou synthétiques ayant une activité in vivo et in vitro, que l'on peut appeler dans un sens très large enzymes, activateurs, inhibiteurs, antigènes ou anticorps, vitamines et hormones, et, comme elles re-
35 présentent les principes actifs des systèmes insolubles dans l'eau, on les appelle maintenant des effecteurs.

La plupart des effecteurs liés à un support qui ont été décrit jusqu'à présent, sont beaucoup plus stables que les substances cor-

respondantes à activité biologique en solution.

Des matières de support avantageuses, appelées matrices sont des substances qui sont non seulement insolubles dans des systèmes aqueux, mais montrent aussi une adsorption non-spécifique la plus
5 faible possible. A cet effet, il faut largement éviter des interactions hydrophobes, hydrophiles et ioniques entre la matrice et le partenaire réactionnel de l'effecteur. Une fixation des substances sur l'effecteur qui n'est pas voulue, par exemple une fixation de substances qui ne sont pas de partenaires réactifs spécifiques de
10 l'effecteur, doit être exclue.

Les deux sortes de matrices utilisées jusqu'à présent comme supports pour les substances ayant une activité biologique sont celles qui se lient aux effecteurs par adsorption physique, par exemple le polystyrène, le charbon actif et les perles de verre, et celles
15 qui forment une liaison covalente avec les effecteurs, par exemple les polymères vinyliques, comme les homo- et copolymères, par exemple les acides polyacryliques, les polyacrylamides et le polystyrène substitué par des groupes amino, carboxy ou sulfonyles, de plus la cellulose et ses dérivés et enfin des polypeptides et protéines na-
20 turelles et synthétiques. A cause de l'interaction équilibrée entre la matrice et l'effecteur, les hydrates de carbone, en particulier la cellulose, le dextranne, l'amidon, l'agar-agar et ses dérivés, sont les matières les plus utilisées comme matrices dans des systèmes aqueux, bien que les groupes carboxyles contenus souvent dans les
25 matières naturelles soient considérés comme gênants en raison de leur affinités non-spécifiques. A part cela, ces matières ont une stabilité thermique et chimique relativement faible.

Beaucoup de ces inconvénients pouvaient être éliminés par l'utilisation comme matrice de polyvinylène-glycol, un polymère synthéti-
30 que. Le polyvinylène-glycol, aussi appelé polyhydroxyméthylène, est préparé par hydrolyse acide ou basique à partir de carbonate de polyvinylène. Chaque atome de carbone porte un groupe hydroxyle et un atome d'hydrogène. La liaison -C-C ininterrompue donne au support une stabilité particulièrement grande.

35 Or, la Demanderesse a trouvé que l'on pouvait utiliser, au lieu du polyvinylène-glycol avantageusement des copolymères de vinylène-glycol comme matrice de support. En introduisant par polymérisation des comonomères convenables dans le carbonate de polyvinylène, on

peut largement faire varier les propriétés physiques et chimiques du polyvinylène-glycol qui est préparé à partir de celui-ci.

Ainsi, par exemple, on peut faire varier l'hydrophilie ou la propriété de gonflage du polyvinylène-glycol en introduisant par 5 polymérisation des monomères hydrophobes, par exemple l'éthylène, le chlorure du vinyle ou le styrène dans le carbonate de polyvinylène. Par la copolymérisation d'acétate de vinyle, un groupe vinylène-glycol est remplacé par un groupe alcool vinylique dans le produit final saponifié; ce qui a pour conséquence une propriété de gonflage 10 accrue en milieu aqueux.

L'utilisation de comonomères, par exemple l'éther divinylque du diéthylène-glycol et le divinyl benzène permet une réticulation et ainsi une amélioration des propriétés mécaniques du support. En introduisant par polymérisation des fonctions électrophiles, par 15 exemple des groupes oxiranes (groupes époxy) à partir de l'éther de vinyle et de glycidyle comme comonomères, une réaction directe de la matrice avec les fonctions nucléophiles ($-NH_2$, $-OH$, etc..) est possible. Les groupes carboxyles peuvent être introduits par des esters d'acide acrylique comme comonomères. Après la copolymérisation, 20 les groupes ester sont saponifiés pour donner des groupes carboxyles. L'introduction de groupes $-NH_2$ - ou $-COOH$ permet l'activation à l'aide de carbodiimides, de sels d'isoxazolium, d'aldéhyde glutarique et d'autres. Les copolymères du vinylène-glycol/alcool vinylique ont une surface spécifique supérieure et ainsi une capacité de liaison 25 accrue par exemple pour des protéines à la surface de la poudre du polymère par rapport aux homopolymères du vinylène-glycol.

La présente invention a par conséquent pour objet des combinaisons à activité biologique à partir d'un copolymère, de préférence insoluble dans l'eau, du polyvinylène-glycol et d'une substance 30 ayant une activité biologique liée à celui-ci tout en conservant son activité biologique. Dans ces combinaisons, la matrice de support est un copolymère du polyvinylène-glycol contenant jusqu'à 45 %, de préférence de 5-20 % d'un comonomère. Les substances ayant une activité biologique sont des enzymes, des activateurs, des inhibiteurs, 35 des antigènes ou anticorps, d'autres protéines de plasma, des substances des groupes sanguins, des phytohémagglutinines, des antibiotiques, des vitamines ou des hormones, des peptides ou des acides ou des effecteurs préparés par voie synthétique.

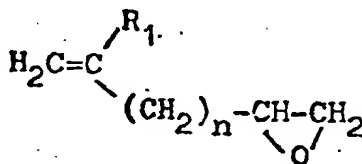
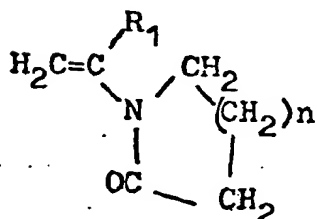
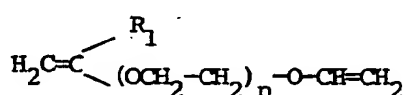
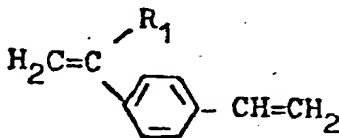
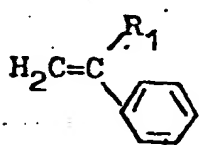
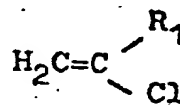
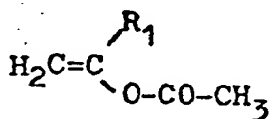
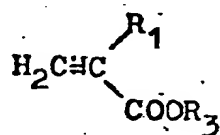
Le support polymère et la substance biologiquement active sont liés l'un à l'autre par une liaison covalente soit directement soit par une chaîne latérale (Spacer).

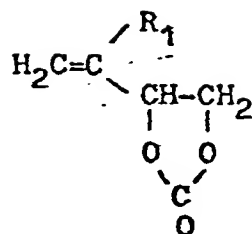
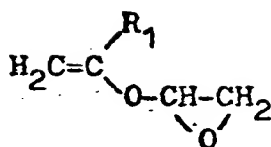
Il est avantageux de lier les substances biologiquement actives par une chaîne latérale (Spacer) si les poids moléculaires de leurs partenaires d'affinité sont très différents ou si, utilisés dans un procédé biospécifique, on fait participer des protéines à très haut poids moléculaire ou qui comprennent plusieurs sous-unités dans leur structure. Les chaînes latérales dites "Spacers" d'une longueur définie sont ancrées dans la matrice polymère et peuvent être obtenues par introduction par polymérisation, par addition ou incorporation (liaison de composés bi- ou polyfonctionnels, par exemple un tripeptide, à la matrice), ou par incorporation de groupes fonctionnels et prolongation graduelle.

L'invention a en outre pour objet des procédés pour fixer de manière covalente des substances biologiquement actives au support.

On dispose, à cette fin, d'une série de réactions généralement connues.

Parmi elles, on compte le procédé de préparation des copolymères du polyvinylène-glycol caractérisé en ce que l'on polymérise le carbonate de vinylène avec des comonomères de formule générale :





dans lesquelles :

R_1 désigne l'hydrogène, le radical méthyle ou éthyle,

R_2 désigne le radical méthyle, éthyle ou propyle,

n est un nombre entier de 1 à 4.

La polymérisation du carbonate de polyvinylène est effectuée avec jusqu'à 45 % de comonomères, de préférence avec 5-20 %.

On peut préparer la combinaison biologiquement active par exemple par l'introduction d'un groupe électrophile soit dans la substance biologiquement active soit dans le copolymère du polyvinylène-glycol et par réaction de la substance biologiquement active avec les copolymères du polyvinylène-glycol par l'intermédiaire de ce groupe. Les groupes électrophiles sont introduits dans la matrice de support soit par copolymérisation du carbonate de vinylène avec des comonomères contenant des groupes électrophiles soit par réaction de la matrice de support avec des composés à bas poids moléculaire portant des groupes électrophiles activants.

En général, le couplage chimique d'un partenaire réactionnel avec la matrice de support est simple lorsque d'un côté sont présentes des fonctions nucléophiles et de l'autre des fonctions électrophiles. Des fonctions nucléophiles réactives sont surtout des groupes amino, mercapto et hydroxy qui sont généralement déjà contenus dans la matrice ou dans le partenaire réactionnel. Les fonctions électrophiles, par contre, doivent être introduites. A cet effet, on peut convertir des groupes carboxyles en halogénures d'acides, azides d'acide, anhydrides d'acide, imidazolides ou bien les activer directement avec les carbodiimides. Comme groupes réactifs électrophiles on utilise également des groupes isocyanate, isothiocyanate, diazonium ou des esters d'imidocarbonate cycliques. L'introduction

de groupes réactifs à l'aide de la copolymérisation est particulièrement favorable.

Par l'introduction par polymérisation de monomères avec des groupes époxy, par exemple avec des éthers d'époxyalkyle et de vinyl-
5 le dans le carbonate de polyvinylène et en raison des différences très grandes dans la vitesse de saponification entre les groupes, carbonate et époxy cycliques, on obtient facilement une matrice du polyvinylène-glycol avec des groupes époxy réactifs que l'on peut faire réagir avec des fonctions nucléophiles. Ainsi est possible la
10 fixation directe d'une substance biologiquement active et/ou l'introduction (la prolongation d'une chaîne latérale dite "Spacer").

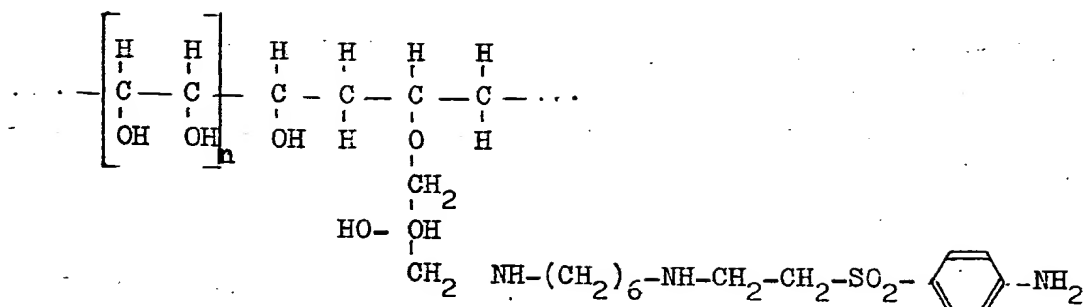
Un autre avantage de l'utilisation de copolymères est l'introduction directe par polymérisation de fonctions électrophiles permettant une réaction selon des méthodes connues.

15 Par copolymérisation du carbonate de vinylène avec de l'acrylate d'éthyle et saponification ultérieure des polymères, on obtient une matrice ayant des fonctions -OH- et -COOH-. Les groupes carboxyles peuvent être activés à l'aide des carbodiimides et puis former une liaison amide avec les groupes amino de l'effecteur. Les groupes
20 carboxyles permettent également la formation de liaisons amide à l'aide des sels d'isoxazolium introduits par Woodward.

Une autre méthode de couplage de composés biologiquement actifs aux polymères contenant des groupes carboxyles est effectuée à l'aide de N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy 1,2-dihydroquinoléine (EEDQ).

25 Les groupes carboxyles peuvent être estérifiés selon des méthodes connues, puis l'ester peut être converti en l'hydrazide et l'azide en résultant peut être fixé à l'aide du groupe amino de la protéine de l'effecteur à la matrice du polyvinylène-glycol.

Lorsque le comonomère introduit par polymérisation dans la matrice possède, à la suite de réactions ultérieures des groupes amino
30 libre, il est possible d'introduire les groupes arylamino avec des dérivés du vinylsulfone contenant des groupes arylamino ou des esters d'acide sulfurique de β -hydroxy-éthylsulfones, les groupes arylamino étant alors diazotés selon des méthodes connues et pouvant
35 être liés ensuite à des groupes réactifs d'un effecteur, par exemple



On peut ainsi également prolonger une chaîne latérale (dite "Spacer").

Selon une autre méthode de liaison de protéines par des groupes amino on utilise du glutardialdéhyde.

La fixation de l'effecteur à la matrice après une activation des groupes hydroxyles ou amino du copolymère de polyvinylène-glycol est réalisée d'une façon simple en utilisant des halogénures de cyanogène, avantageusement le bromure de cyanogène, avec réaction ultérieure des effecteurs biologiquement actifs contenant des groupes amino par ces groupes activés.

L'effecteur peut aussi être fixé à la matrice constituée par un copolymère du polyvinylène-glycol ou un polyvinylène-glycol par acylation des groupes hydroxyles avec du bromure de bromoacétyle, suivie de l'alkylation du groupe amino de l'effecteur.

Des réactions similaires se réalisent par exemple par la transformation des groupes hydroxyles du support avec des triazines réactives, une partie des groupes réactifs de la triazine réagissant avec le composé constitué par le polyvinylène-glycol, l'autre avec des groupes amino de l'effecteur.

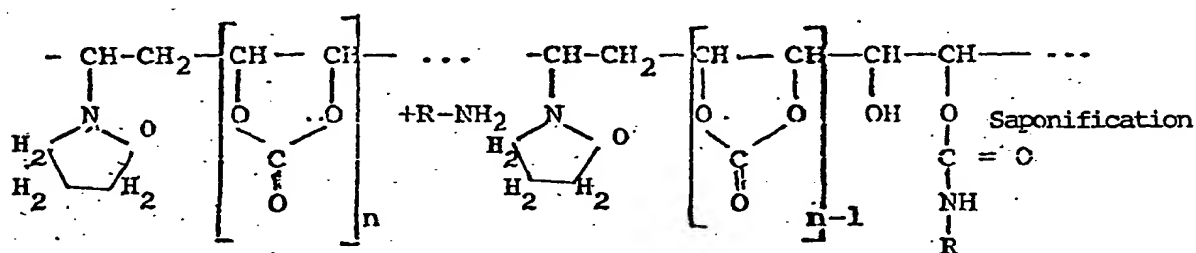
Des amines aromatiques diazotables qui peuvent d'une part réagir avec les groupes hydroxyles du support par un autre groupe réactif, permettent d'autre part le couplage avec des amino acides activés appropriés, par exemple les restes de tyrosine ou d'histidine de la protéine constituant l'effecteur.

Des dérivés de vinylsulfone et des héli-esters sulfuriques de β -hydroxyéthylsulfones contenant des groupes arylamino peuvent réagir avec les groupes hydroxyles du support. Ils permettent la fixation de l'effecteur selon la réaction de diazotation décrite ci-dessus.

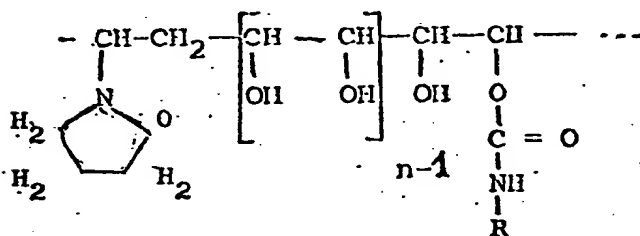
On obtient des liaisons éther particulièrement stables lors de la réaction des groupes hydroxyles du copolymère du polyvinylène-glycol avec des époxydes ne formant pas d'ions et qui contiennent au

moins 2 groupes réactifs, par exemple les épihalohydrines ou les polyépoxydes, par exemple l'épichlorhydrine ou les bisépoxydes.

Une autre méthode de modification est l'introduction par polymérisation de comonomères dans la chaîne du carbonate de polyvinylène (par exemple le vinylpyrrolidone) suivie d'une réaction partielle des cycles cyclocarbonates du carbonate de polyvinylène avec une amine, par exemple l'hexaméthylène-diamine, pour obtenir un copolymère du carbonate de polyvinylène substitué par une chaîne latérale (dite Spacer) ou l'effecteur par une liaison uréthane. Les autres 10 groupes de cyclocarbonate sont alors saponifiés pour obtenir des groupes hydroxyles :



Carbonate de polyvinylène



A côté des procédés d'obtention de liaisons covalentes entre la matrice et l'effecteur protéinique ou d'autres effecteurs cités à titre d'exemple, il existe encore d'autres méthodes conduisant à la réaction des groupes hydroxyles ou de certains groupes du copolymère avec l'effecteur et ainsi à une liaison covalente entre les deux; ainsi, par exemple la réaction connue avec des composés métalliques formant des complexes, par exemple les composés du titane. Toutes ces méthodes sont connues des spécialistes.

Lors de la fixation de composés biologiquement actifs à bas poids moléculaire, il est avantageux d'activer l'effecteur au lieu du support.

En principe, on peut utiliser tous les procédés qui sont connus dans la chimie des macromolécules pour la modification de composés macromoléculaires synthétiques ou naturels.

Les copolymères du polyvinylène-glycol se distinguent non seulement par leur stabilité chimique et thermique mais aussi par des propriétés favorables quant à leur mise en oeuvre. Ils sont ainsi supérieurs aux matrices de support considérées jusqu'à présent comme optimales à base d'hydrates de carbone naturels. Ils peuvent être préparés sous forme de fibres, de filaments, de feuilles ou de particules sphériques, la forme la plus adéquate pouvant ainsi être choisie selon le domaine d'application de l'effecteur à lier à celle-ci. De préférence, ces copolymères sont utilisés sous forme de poudres finement divisées ayant une grande surface spécifique.

Comme la dimension de la surface susceptible de fixer des effecteurs ou des chaînes latérales ("Spacer") peut être réglée lors de la préparation, les copolymères du polyvinylène-glycol ont un avantage de plus sur les matières de support connues.

Les composés biologiquement actifs conformes à l'invention conviennent dans la plupart des procédés qui sont connus pour d'autres effecteurs hydrophiles liés à des supports insolubles dans l'eau. On peut aussi rendre insoluble des enzymes. Les enzymes insolubles sont de plus en plus utilisées pour la détermination de substrats dans des appareils automatiques d'analyse et comme électrodes enzymatiques. A cause de la stabilité élevée une série d'enzymes liées à un support conviennent pour la réalisation de réactions techniques enzymatiques.

Les substances biologiquement actives liées à un support sont largement mises en oeuvre, en raison de leur propriété d'adsorbant spécifique, dans la chromatographie d'affinité. Les inhibiteurs d'enzymes naturels ou synthétiques liés à un support permettent la purification poussée des enzymes, alors que les enzymes en tant qu'effecteurs se sont avérées excellentes pour l'obtention d'inhibiteurs d'enzyme naturels à partir d'extraits bruts. Les antigènes insolubles dans l'eau liés à un support sont utilisés pour l'isolement des anticorps correspondants, qui sont ainsi obtenus dépourvus d'autres éléments du sérum et d'autres antigènes. Dans la chromatographie d'affinité, il est possible d'isoler et aussi de déterminer quanti-

tativement des anticorps ne pouvant pas être précipités et des anticorps qui ne peuvent pas être précipités en raison de leur faible concentration dans le sérum.

Les Exemples suivants illustrent la présente invention:

5 Exemples

Préparation des copolymères du carbonate de vinylène

Le carbonate de vinylène utilisé dans la préparation des copolymères est chauffé au reflux sous une pression de 33 mm avant la mise en oeuvre pendant une heure sur du borhydrure de sodium (100 parties en poids de carbonate de vinylène sur 2 parties en poids de NaBH_4), puis distillé à 75° C et sous une pression de 33 mm sur une colonne à chemise en argent remplie d'anneaux en verre de Raschig à 50 cm et le plus vite possible mis en oeuvre pour la copolymérisation. De même, les comonomères utilisés ont été d'abord purifiés
15 par distillation.

1 - Copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique à partir de copolymère de carbonate de vinylène acétate de vinyle.

a) On dissout dans 9 parties en poids de carbonate de vinylène et 1 partie en poids d'acétate de vinyle 0,05 partie en poids d'azobisisobutyronitrile sous de l'azote. On introduit le mélange de monomère sous de l'azote dans un tube d'aluminium aplati avec une fermeture à vis (épaisseur 4 mm, largeur 60 mm, longueur 150 mm) (volume de remplissage total: environ 35 ml), on ferme le tout sous N_2 et on le plonge pendant 48 heures dans un bain d'eau à 50° C. On
25 obtient des plaques de matière plastique dures et fragiles que l'on coupe en morceaux dans un broyeur à battoirs. Puis, on chauffe le granulé à 120° C pendant 5 heures sous une pression de 1-2 mm, pour séparer les monomères résiduels qui n'ont pas été polymérisés.

On broie le granulé ainsi dépourvu de monomères dans un broyeur
30 à une dimension des grains de $< 0,1$ mm dans 500 parties de lessive de soude 5 N, on mélange le tout à 20° C pendant une heure à l'aide d'un agitateur à vitesse élevée; les groupes carbonate et acétyle sont alors saponifiés. Onessore le copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique insoluble dans l'eau, on le lave soigneusement avec
35 de l'eau jusqu'à ce qu'il soit exempt de sels minéraux et on le lyophilise.

Rendement : 4,7 parties en poids de copolymère de vinylène-glycol/

alcool vinylique ayant une surface spécifique de $34 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ mesurée selon la méthode BET.

b) On procède comme cela a été décrit sous 1-a) sauf qu'on utilise pour 7 parties en poids de carbonate de vinylène 3 parties 5 d'acétate de vinyle.

Rendement : 4,1 parties en poids de copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique ayant une surface spécifique de la poudre de polymère lyophilisée de $62,5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

c) Essai comparatif comme il a été décrit sous 1-a) sauf qu'on 10 utilise 10 parties en poids de carbonate de vinylène et pas de comonomère.

Rendement : 4,7 parties en poids d'un homopolymère de vinylène-glycol ayant une surface spécifique de la poudre de polymère lyophilisée de $20,5 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$.

15 2 - Copolymère de vinylène-glycol/éther de vinyle et de glycidyle

On chauffe à 50°C pendant 3 jours sous N_2 un mélange de 7 parties en poids de carbonate de vinylène, 3 parties en poids d'éther de vinyle et de glycidyle et 0,1 partie en poids d'azibisisobutyronitrile comme cela a été décrit sous 1-a) dans des tubes d'aluminium aplatis. On coupe en morceaux les plaques synthétiques obtenues comme il a été décrit sous 1-a), on élimine les monomères résiduels, on broie les morceaux à une dimension des grains de $< 0,1 \text{ mm}$, les met en suspension pendant 30 minutes dans 500 parties en poids de NaOH 25 0,5 N glacé avec un agitateur à haute vitesse, on sépare le polymère saponifié immédiatement par centrifugation, le met en suspension dans de l'eau glacée, le neutralise à pH 7 avec H_2SO_4 2N en refroidissant avec de la glace, on l'essore, le lave avec de l'eau glacée et le lyophilise.

30 Rendement : 3,9 parties en poids de copolymère de vinylène-glycol/éther de vinyle et de glycidyle contenant 1,3 milliéquivalents de groupes oxiranne par g (déterminé selon "Praktikum der makromolekularen organischen Chemie", page 221, par Braun, D., Cherdron, J., Kern, W., Hüthig Verlag, Heidelberg 1966).

35 3 - Copolymère servant de matière de support substitué par un groupe amino

On met en suspension 3,9 parties en poids d'un copolymère de

vinylène-glycol/éther de vinyle et de glycile (de l'Exemple 2) avec un agitateur Ultra-Turrax dans 100 parties en poids de H_2O et on ajoute 10 ml d'ammoniaque à 30 %. On continue à agiter avec un petit agitateur magnétique à 50° C pendant 10 heures, puis on essore et

5 on lave soigneusement avec de l'eau et on lyophilise.
Rendement : 3,5 parties en poids de copolymère servant de matière de support contenant 0,9 milli équivalents de groupes amino par gramme, sous la forme de groupes β -amino-2-hydroxy-propyliques (provenant de la réaction de l'ammoniaque avec des groupes glycidyles).

10 4 - Copolymère de vinylène-glycol/acide acrylique

On polymérise 9 parties en poids de carbonate de vinylène, 1 partie en poids d'acrylate d'éthyle et 0,05 partie en poids d'azobisisobutyronitrile sous N_2 comme cela a été décrit à l'Exemple 1-a), on coupe le polymère en morceaux, on élimine les monomères résiduels

15 et on broie les morceaux pour obtenir une dimension des grains de $< 0,1$ mm, on saponifie, on essore, on lave et on lyophilise.
Rendement : 5,0 parties en poids de poudre de polymère hydrophile contenant 1,1 milli équivalents de groupes carboxyles par gramme de support ayant une surface spécifique de $27,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ déterminée selon

20 la méthode BET.

5 - Polyvinylène-glycol substitué par des groupes ω -amino-hexyles

On met en suspension 5 parties en poids de copolymère de vinylène-glycol/acide acrylique de l'Exemple 4, à l'aide de l'agitateur

25 Ultra-Turrax dans 100 ml de H_2O , on refroidit à 5° C, on ajoute 2,5 g de N-cyclohexyl-N'-(N-méthylmorpholino)-éthyl)-carbodiimide-p-toluène-sulfonate, on agite pendant 30 minutes à pH 5 et à 5° C, on sépare par filtration et on lave rapidement avec de l'eau glacée. On met en suspension le support activé ensuite immédiatement dans une solu-

30 tion ajustée à pH 7,5 avec du HCl binormal et refroidie à 5° C de 5 g d'hexaméthylène-diamine dans 100 ml d'eau et on continue à agiter dans ces conditions pour encore 24 heures avec un agitateur magnétique, on essore, on lave soigneusement avec de l'eau et on lyophilise.

35 Rendement : 4,5 parties en poids de polyvinylène-glycol substitué par des groupes ω -amino-hexyles contenant 0,7 milliéquivalents de groupes amino par gramme du support.

6 - Réaction du copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique de l'Exemple 1-a) ayant une surface spécifique de $34 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ selon BET

a) avec de l'épichlorhydrine :

5 On met en suspension 50 g d'un copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique, préparé selon l'Exemple 1-a) dans 1 l de NaOH bi-normal, on ajoute 250 ml d'épichlorhydrine et on agite pendant 2 heures à $55-60^\circ \text{C}$. Le pH de la suspension s'abaisse après peu de temps à 10-11. Cette valeur est maintenue encore pendant 1 heure
10 par addition de NaOH. Après 2 heures de réaction on essore la substance solide, on lave avec de l'eau, de l'acétone, puis encore avec de l'eau.

b) avec de l'hexaméthylène-diamine :

On dissout 50 g d'hexaméthylène-diamine dans 1,5 l d'eau et on
15 ajoute du HCl jusqu'à ce que pH 10 soit atteint. On ajoute à cette solution le copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique activé selon l'Exemple 6-a) et on agite pendant 6 heures à $50-55^\circ \text{C}$. Puis, on essore le produit et on lave avec de l'eau jusqu'à ce qu'il soit exempt d'hexaméthylène-diamine.

20 c) avec de l'ester sulfurique de 1-aminobenzène-4- β -hydroxy-éthylsulfone :

On agite le produit obtenu sous 6-b) avec 50 g d'ester sulfurique de 1-aminobenzène-4- β -hydroxyéthylsulfone à 55°C et à pH 10 pendant 1 heure, puis on sépare la substance solide par filtration,
25 on lave avec de l'eau, de l'acétone puis de l'eau.

d) diazotation :

On lave 10 g du produit obtenu selon l'Exemple 6-c) sur un filtre avec 200 ml de HCl 0,1 N, puis on le met en suspension dans 300ml de HCl 0,5 N. On ajoute à cette suspension, tout en agitant, une solution de NaNO_2 0,1 N à $0-4^\circ \text{C}$, jusqu'à ce que l'on constate un faible excès de nitrite dans l'essai avec du papier à l'empois d'amidon et à l'iodure de potassium. Au bout de 10 minutes, on sépare par filtration sur un filtre et on lave le résidu avec de l'eau glacée et puis avec un tampon de phosphate de sodium 0,15 M à pH 7,5 à
35 $0-4^\circ \text{C}$.

e) liaison covalente avec une protéine :

On dissout 0,8 g d'albumine dans 350 ml de tampon de phosphate à pH 7,5, puis on refroidit à 4°C et on ajoute le produit préparé

sous 6-d). On agite la suspension pendant 20 heures à 4° C, on sépare par filtration et on lave la substance solide avec du NaCl 1 M et une solution de chlorure de sodium (PBS) tamponnée par du phosphate (solution aqueuse de NaCl à 0,9 % ayant une teneur en 1/15 M de tampon de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ de pH 7,2).

On examine le filtrat et la solution de lavage selon la méthode de l'immunodiffusion radiale pour détecter l'albumine. 60 mg d'albumine sont fixés sur 1 g du support ainsi préparé.

- 10 7 - Réaction du copolymère de vinylène-glycol/alcool vinylique selon l'Exemple 1-b) ayant une surface spécifique de $62,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ selon BET
-

En utilisant les réactions comme elles ont été décrites sous 6-a), il est possible de fixer quantitativement sur 1 g de support activé 80 mg d'albumine.

- 15 8 - Réaction de l'homopolymère de vinylène-glycol de l'Exemple 1-c) ayant une surface spécifique de $20,5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ selon BET
-

En utilisant les réactions comme celles décrites sous 6-a) on peut fixer quantitativement 45 mg d'albumine sur 1 g de support activé.

- 20 9 - Copolymère de vinylène-glycol/vinyl pyrrolidone substituée par des groupes ω -aminohexyles
-

On dissout dans 9 parties en poids de carbonate de vinyle et 1 partie en poids de vinylpyrrolidone 0,05 partie en poids d'azobiisobutyronitrile sous de l'azote et on polymérise et effectue le traitement postérieur comme à l'Exemple 1-a).

Après élimination des monomères résiduels on dissout le granulé pour obtenir une solution dans le diméthylformamide à 12 % en poids, puis on introduit par un tuyau cette solution dans un bain de précipitation de méthanol sous une pression de 15 atm relatives. On obtient le précipité fibreux du copolymère de carbonate de vinylène/vinylpyrrolidone, on l'essore, le lave avec du méthanol et le remet en suspension dans 200 parties en poids de méthanol. On ajoute 6 parties en poids de hexaméthylène-diamine, dissous dans 50 parties en poids de méthanol, on agite la suspension à température ambiante pendant 2 jours, on essore et on lave avec du méthanol. On met en suspension le résidu filtré dans une solution de 10 parties en poids

de méthylate de sodium dans 300 parties en poids de méthanol à 96 % pendant 4 jours à la température ambiante, puis on lave avec du méthanol, puis très intimement avec de l'eau, puis on lyophilise.

Rendement : 5,0 parties en poids d'un copolymère de vinylène-glycol/5 vinylpyrrolidone substitué par des groupes ω -aminohexyles par des liaisons uréthane et contenant 1,6 milliéquivalents de groupes NH_2 par g de support.

- 10 - Liaison de IgG au copolymère substitué par des groupes ω -amino-hexyles de l'Exemple 9-, à l'aide d'anhydride succinique et de carbodiimide hydrosoluble

On fait réagir 5 parties en poids du support substitué par des groupes ω -aminohexyles de l'Exemple 9-, à 10° C et pH 6 avec 2,5 parties en poids d'anhydride d'acide succinique, qui ont été mises en suspension dans 200 parties en poids d'eau, pendant 4 heures. On ajuste le pH avec NaOH 2N. Après le lavage de la substance solide avec de l'eau on agite le produit avec 1,25 parties en poids de N-cyclohexyl-N'-(N-méthylmorpholino)-éthyl)-carbodiimide-p-toluène-sulfonate à pH 5 et à 5° C pendant 30 minutes; on sépare par filtration et on lave rapidement avec de l'eau glacée. On dissout 0,5 partie en poids de IgG dans 150 parties en poids de tampon de phosphate à pH 7,5 et on agite cette solution à 4° C pendant 24 heures avec le support activé. Après filtration, on lave le produit avec une solution de chlorure de sodium 1 M et avec du PBS.

75 mg de IgG forme une liaison covalente avec 1 g du support.

- 11 - Copolymère du vinylène-glycol/éther divinylque du diéthylène-glycol

On dissout sous de l'azote dans 9 parties en poids de carbonate de vinylène et 1 partie en poids d'éther divinylque du diéthylène-glycol 0,1 partie en poids d'azobisisobutyronitrile, puis on chauffe cette solution comme cela a été décrit à l'Exemple 1-a) dans des tubes d'aluminium plats sous N_2 pendant 3 jours à 50° C et on polymérise. Après le traitement postérieur et la saponification comme sous 1-a) on obtient 3,5 parties en poids du copolymère de vinylène-glycol/éther divinylque du diéthylène-glycol.

- 12 - Copolymère du vinylène-glycol/N-acryloylaminoacétaldéhyde-diméthylacétal

a) On dissout dans 9 parties en poids de carbonate de vinylène et 1 partie en poids de N-acryloylaminoacétaldéhyde-diméthylacétal

0,05 partie en poids d'azobisisobutyronitrile sous de l'azote. On polymérise le mélange des monomères comme cela a été décrit sous 1-a), puis on poursuit le traitement et on saponifie pour obtenir 4,1 parties en poids du copolymère de N-acryloylaminoacétaldéhyde-diméthylacétal/vinylène-glycol. On agite 10 parties en poids de copolymère de N-acryloylaminoacétaldéhyde-diméthylacétal/vinylène-glycol dans 100 parties en poids de HCl normal pendant 4-5 heures. On lave le support activé avec de l'eau et du tampon de phosphate à pH 7,5.

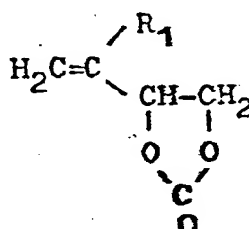
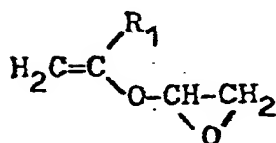
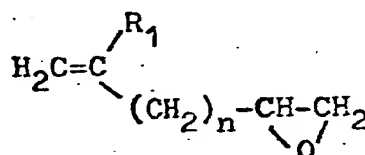
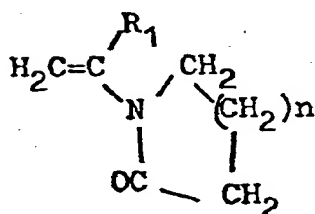
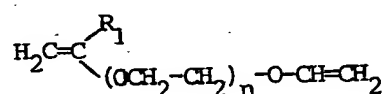
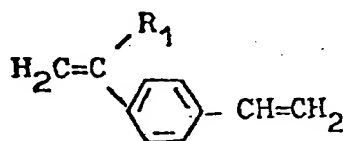
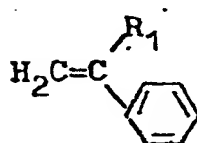
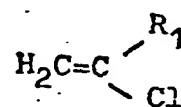
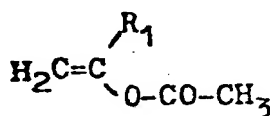
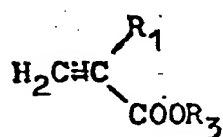
b) On a dissout 0,5 g d'albumine dans 200 ml de PBS et on agite cette solution avec le produit préparé sous a) pendant 14 heures à 4° C. Après filtration, on lave la protéine liée au support avec une solution de NaCl 1 M et avec du PBS.

40 mg d'albumine sont liés à 1 g du support ainsi préparé.

Revendications

1 - Combinaison d'un copolymère du vinylène-glycol et d'une substance biologiquement active liée chimiquement à ce copolymère.

2 - Combinaison selon la revendication 1, caractérisée en ce que le copolymère contient au moins 55 % de motifs de monomère constitués par du vinylène-glycol et au plus 45 % de motifs de monomères constitués par au moins l'un des composés de formules



dans lesquelles :

R_1 désigne l'hydrogène, le radical méthyle ou le radical éthyle,

R_3 désigne le radical méthyle, éthyle ou propyle et n est un nombre entier entre 1 et 4.

3 - Combinaison selon la revendication 1, caractérisée en ce que la substance biologiquement active est une enzyme, un activateur, un inhibiteur, un antigène ou un anticorps, une protéine de plasma, une substance des groupes sanguins; un phytohémagglutinine, un antibiotique, une vitamine ou une hormone, un peptide ou un amino acide,

un effecteur naturel ou synthétique.

4 - Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que : on fait réagir un copolymère du carbonate de vinylène avec une substance biologiquement active et on convertit
5 alors les groupes cyclocarbonates encore présents en groupes hydroxyles.

5 - Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que : on convertit les groupes cyclocarbonates d'un copolymère du carbonate de vinylène en groupes hydroxyles et
10 a) on fait réagir des groupes électrophiles présents dans le copolymère ou qui ont été introduits dans celui-ci avec une substance biologiquement active ou
b) on fait réagir ces groupes hydroxyles

(1) soit d'abord avec un composé contenant des groupes électro-
15 philes, puis avec une substance biologiquement active,

(2) soit immédiatement avec une substance biologiquement active qui porte des groupes électrophiles.

6 - Agent contenant une combinaison selon la revendication 1.

7 - Utilisation d'une combinaison selon la revendication 1 pour
20 la chromatographie d'affinité, pour effectuer des réactions immunologiques ou des réactions enzymatiques.

THIS PAGE BLANK (USPTO)